

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Januar 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/009818 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53, 9/02, A61K 38/44

(30) Angaben zur Priorität: 102 32 621.5 14. Juli 2002 (14.07.2002) DE

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002401

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): STIFTUNG ALFRED-WEGENER-INSTITUT FÜR POLAR- UND MEERESFORSCHUNG [DE/DE]; Columbusstrasse, 27568 Bremerhaven (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum: 13. Juli 2003 (13.07.2003)

(72) Erfinder; und

(25) Einreichungssprache: Deutsch

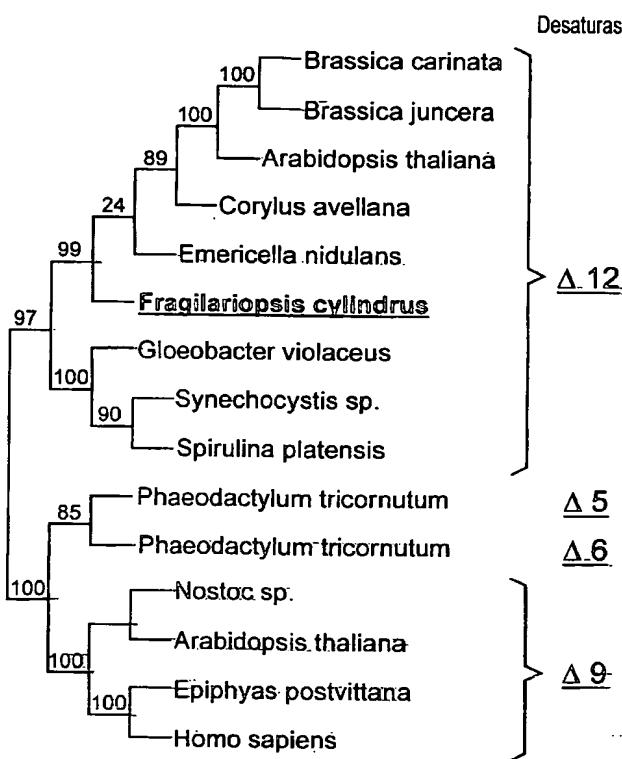
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MOCK, Thomas [DE/DE]; Bürgermeister-Smidt-Strasse 178, 27568 Bremerhaven (DE). VALENTIN, Klaus [DE/DE]; Hafenstrasse 62, 27576 Bremerhaven (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NUCLEIC ACID SEQUENCE CODING FOR ENZYME DELTA-12-DESATURASE AND ORIGINATING FROM FRAGILARIOPSIS CYLINDRUS, ASSOCIATED POLYPEPTIDE, AND USE OF THIS NUCLEIC ACID SEQUENCE AND POLYPEPTIDE

(54) Bezeichnung: FÜR EIN ENZYM DELTA-12-DESATURASE KODIERENDE NUKLEINSÄURESEQUENZ AUS FRAGILARIOPSIS CYLINDRUS, ZUGEHÖRIGES POLYPEPTID UND VERWENDUNG VON BEIDEN



(57) Abstract: Enzymes from the group consisting of delta-2-desaturases catalyze an important step for the synthesis of multiple unsaturated fatty acids, which are essential to humans and which, for all eukaryotes, serve as important structural elements of the cell membrane and control many vital processes in the organism. This concerns essential nutrients, the need for which having to be covered mainly from plant and animal sources. Known organisms, in which a delta-12-desaturase enzyme naturally occurs, originate exclusively from warm regions, therefore the production of fatty acids requires a supply of heat that is financially expensive and involves the use of extensive equipment. However, organisms also exist that have enzymes that are adapted to the cold. The invention thus relates to a nucleic acid sequence, which codes for enzyme delta-12-desaturase, originates from the marine diatom *Fragilariaopsis cylindrus* that is adapted to the cold, and which is formed according to SEQ ID No.1 or as a functional variant or as a segment having at least 8 nucleotides thereof. This results in the provision of a gene that codes for an enzyme, which has properties adapted to the cold and which is important for producing fatty acids, thereby enabling a particularly economical production of fatty acids.



(74) Gemeinsamer Vertreter: ALFRED-WEGENER-INSTITUT FÜR POLAR- UND MEERESFORSCHUNG; Herr U. Kersten, Gewerbliche Schutzrechte und Lizenzen, Postfach 120161, 27515 Bremerhaven (DE).

(81) Bestimmungsstaat (*national*): US.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Enzyme aus der Gruppe der Delta-2-Desaturasen katalysieren einen wichtigen Schritt zur Synthese der für Menschen essentiellen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die allen Eukarioten als wichtige Strukturelemente der Zellmembran dienen und viele lebenswichtige Prozesse im Organismus steuern. Dabei handelt es sich um essentielle Nährstoffe, deren Bedarf hauptsächlich aus pflanzlichen und tierischen Quellen gedeckt werden muss. Bekannte Organismen, in denen ein Delta-12-Desaturase-Enzym natürlicherweise vorkommt, stammen jedoch ausschliesslich aus wärmeren Regionen, is sodass bei der Fettsäureproduktion eine ökonomisch und apparatechnisch aufwändige Wärmezufuhr erforderlich ist. Bekannt sind jedoch auch Organismen, die kälteangepasste Enzyme aufweisen. Die Erfindung beansprucht daher für ein Enzym Delta-12-Desaturase eine kodierende Nukleinsäuresequenz, die aus der kälteangepassten marinen Diatomee *Fragilariaopsis cylindrus* stammt und gemäss SEQ ID No.1 oder als funktionelle Variante oder als Abschnitt mit mindestens 8 Nukleotiden davon ausgebildet ist. Damit wird ein Gen zur Verfügung gestellt, das ein bei der Fettsäureproduktion wichtiges Enzym mit kälteangepassten Eigenschaften kodiert, sodass eine besonders wirtschaftliche Fettsäureproduktion ermöglicht wird.

FÜR EIN ENZYM DELTA-12-DESATURASE KODIERENDE NUKLEINSÄURESEQUENZ AUS
FRAGILARIOPSIS CYLINDRUS, ZUGEHÖRIGES POLYPEPTID UND VERWENDUNG VON BEIDEN

5 **Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine für das Enzym Delta-12-Desaturase (Δ 12-Desaturase) kodierende Nukleinsäuresequenz, auf das zugehörige Polypeptid und auf Verwendungen sowohl der Nukleinsäuresequenz selbst als auch des zugehörigen Polypeptids.

Enzyme aus der Gruppe der Δ 12-Desaturasen katalysieren einen wichtigen Schritt zur Synthese der für Menschen essentiellen Linolsäure, die allen Eukarioten als wichtiges Strukturelement der Zellmembran dient und mit den 10 aus ihr entstehenden Eicosanoiden viele lebenswichtige Prozesse im Organismus steuert. Ferner ist Linolsäure, die der Mensch aufgrund des Fehlens des Enzyms Δ 12-Desaturase nicht selbst herstellen kann, der Ausgangspunkt für die Synthese weiterer essentieller Fettsäuren, z.B. Arachidonsäure (AA, Eicosatetraensäure ETA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA).

In **Figur 1** ist ein allgemeines Schema der Biosynthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFAs) und den beteiligten Enzymen in Eukaryoten dargestellt. Die Umwandlung von 25 Stearinsäure (18 Kohlenstoffe: 0 Doppelbindungen) zu Ölsäure (18:1, Δ 9) wird durch eine Δ 9-Desaturase katalysiert. Ölsäure wird durch eine Δ 12-Desaturase in Linolsäure (18:2, Δ 9,12; kurz LA) umgewandelt, die wiederum durch eine Δ 6-Desaturase in γ -Linolensäure (18:3, Δ 6,9,12; kurz GLA), bzw. durch eine Δ 15-Desaturase in α -Linolensäure (18:3, Δ 9,12,15; kurz ALA) umgewandelt wird. 30 Die Verlängerung der Fettsäuren wird durch Elongasen katalysiert, wodurch z. B. aus γ -Linolensäure Dihomo- γ -Linolensäure (20:3, Δ 8,11,15; kurz DGLA)

gebildet wird, die wiederum durch eine $\Delta 5$ -Desaturase zu Arachidonsäure (20:4 $\Delta 5,8,11,15$; kurz ARA) umgewandelt wird, einem direkten Vorläufer der physiologisch wirksamen Eicosanoide, wie z. B. Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene.

5

Die Familie der PUFAs oder Omega-Fettsäuren (ω -Fettsäuren, bei ω - Zählweise vom Methyl-Ende her), zu denen die aufgeführten Fettsäuren zählen, beeinflussen generell die Innenflächen der Blut- und Lymphgefäß, die Funktion der weißen Blutkörperchen, die Blutgerinnung und Entzündungs- und Immunreaktionen. Bei einer Mangelernährung mit diesen essentiellen Fettsäuren kann es zu Störungen der entsprechenden physiologischen Prozesse kommen. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt eine tägliche Zufuhr von mindestens 12,5 g Linolsäure, die nur bei sehr ausgewogener Ernährung aufgenommen werden. Daher werden Nahrungs-zusatz-Präparate angeboten und Grundnahrungsmittel, z.B. Brot, mit essentiellen Fettsäuren angereichert. Durch diese Maßnahmen soll eine Hilfestellung zur besseren Beherrschung des Risikofaktors Herz-Kreislauf-Erkrankungen geleistet werden.

Da Vertebraten keine Doppelbindungen hinter Position 9, bei Δ -Zählweise vom Carboxy-Ende her, in Fettsäuren einfügen können, sind ungesättigte Fettsäuren wie LA und ALA oder die sie katalysierenden Enzyme $\Delta 12$ - und $\Delta 15$ -Desaturasen essentielle Nährstoffe, deren Bedarf hauptsächlich aus pflanzlichen und tierischen Quellen gedeckt werden müssen. Die meisten PUFAs in Menschen und Tieren stammen entweder direkt aus der Ernährung wie Fischen und bestimmten Pflanzen (Olive, Nachtkerze, Borretsch) oder entstehen durch die Umsetzung der durch die Ernährung zugeführten essentiellen Fettsäuren durch Desaturasen und Elongasen. Deshalb sind die Organismen, in denen diese natürlicherweise vorkommen, von großem kommerziellen Interesse. Zum Forschungsprogramm der Pharma- und Nahrungsmittelindustrie gehört daher die ständige Suche nach neuen Quellen,

insbesondere nach entsprechenden Mikroorganismen. Über die direkte Gewinnung von PUFAs aus solchen Organismen hinaus ist durch die heutigen Möglichkeiten der Gentechnologie aber die Kenntnis der in ihnen wirksamen Gene der PUFA-Biosynthese von besonderem Interesse. Durch die gezielte, 5 funktionelle Expression der Gene in Wirtspflanzen wie Sojabohne oder Mais kann eine kommerzielle Produktion von PUFAs in solchen besser zugänglichen Systemen erreicht werden. Aus diesem Grund besteht ein Bedarf an Genen für Desaturasen und Elongasen der PUFA-Biosynthese, sowie für die Gewinnung von PUFAs durch ökonomische Methoden mit Hilfe dieser 10 Gene.

Die Wirkungsweise von Desaturasen im Fettstoffwechsel ist ausreichend bekannt. Es liegt daher eine ganze Reihe von Veröffentlichungen über die Bereitstellung solcher Enzyme, ihrer Aminosäuresequenzen und der für sie 15 kodierenden Gene vor. Beispielsweise ist aus der **WO9411516** „Genes for microsomal delta-12 fatty acid desaturases and related enzymes from plants“ (1994) eine sehr umfangreiche Darlegung der Erkenntnisse zum Fettstoffwechsel bekannt. Hier werden Δ -12-Desaturasen aus Pflanzen, z.B. Sojabohne, Ölsaft *Brassica* spezies, *Arabidopsis thaliana* und Mais, 20 beschrieben. In einem Expressionsverfahren wird der Einsatz von „Gen-Chimären“ zur Transformation von Pflanzen, d.h. die Manipulation des Wirtsgenoms durch Einbau fremder Gene mittels Vektoren, zur vermehrten Produktion essentieller Fettsäuren offenbart. Eine Delta-12-Desaturase, für die eine Nukleinsäuresequenz aus der gemeinen Haselnuss kodiert, ist aus der 25 **EP 0794250** bekannt. Die **WO0020602** „Delta 6 and delta 12 desaturases and modified fatty acid biosynthesis and products produced therefrom“ (2000) beansprucht Δ -6- und Δ -12-Desaturasen, Nukleinsäuresequenzen, die für solche Proteine kodieren, DNA-Strukturen, die solche Gene enthalten und Mikroorganismen, die erhöhte Mengen solcher Desaturasen exprimieren. Es 30 handelt sich bei den Desaturasen bevorzugt um Isolationen aus dem ölhaltigen Pilz *Mortierella alpina*. In der **DE10044468** „New nucleic acid encoding delta-6-

desaturase, useful for producing ciliates and plants that overproduce unsaturated fatty acids, derived from Tetrahymena" (2001) wird eine γ -Linolensäure aus Linolsäure katalysierende Δ -6-Desaturase, gewonnen aus dem Ciliaten *Tetrahymena thermophila*, beschrieben. Hierbei handelt es sich 5 um ein wärmeliebendes Wimperntierchen, das sein Aktivitätsmaximum bei höheren Temperaturen hat.

Die kommerzielle Herstellung von essentiellen Fettsäuren aus natürlichen Quellen ist jedoch mit einigen Nachteilen verbunden. Sowohl deren Qualität als 10 auch die Quantität schwanken und sie weisen teilweise eine heterogene Zusammensetzung auf, wodurch Reinigungsschritte notwendig werden. Dagegen hat sich gezeigt, dass die Ausbeute bei einigen Mikroorganismen im Vergleich zu höheren Pflanzen deutlich besser ist. Aus diesem Grunde bietet die Herstellung von essentiellen Fettsäuren durch Mikroorganismen eine 15 vielversprechende Alternative zu anderen PUFA-Quellen. Das Fettsäurespektrum vieler Mikroorganismen ist oft recht einfach im Vergleich zu höheren Organismen, was große Vorteile bei der Reinigung bietet. Darüber hinaus ist die fermentative Herstellung nicht von externen Faktoren wie Wetter, Nahrungsangebot etc. abhängig. Außerdem sind auf diese Weise hergestellte 20 PUFA weitgehend frei von Kontaminationen die z. B. auf Umweltverschmutzung zurückzuführen sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch fermentative Prozesse gewonnene PUFA im Gegensatz zu solchen aus natürlichen Quellen keinen Schwankungen in der Verfügbarkeit unterliegen.

25 Des Weiteren entstammen alle in den oben zitierten Druckschriften genannten und auch alle weiteren, derzeit bekannten Organismen zur Fettsäureproduktion aus gemäßigten Klimazonen. Somit benötigen alle geeigneten Organismen zur Produktion essentieller Fettsäuren ihren natürlichen klimatischen Umgebungsbedingungen entsprechende Prozessbedingungen, insbesondere deutlich 30 erhöhte Prozesstemperaturen. Folglich sind stets Einrichtungen zur Temperaturbeaufschlagung, insbesondere aufwändige Zuchtreaktoren zur Produktion erforderlich.

Aus der Veröffentlichung I „Zahllose Geheimnisse der Natur“ von K. Eske (vgl. BioLOG, 3.Ausgabe, Februar 2000, Seiten 2/3, abrufbar unter <http://www.Bioregio.org/biolog-3.pdf>, Stand 04.06.2002) ist es bekannt, 5 kälteangepasste Enzyme aus Bakterien, die in Tiefseeregionen vorkommen, zu isolieren. Neben dem Vorteil, dass kälteangepasste Enzyme zur Expression keine erhöhten Temperaturen benötigen, ergibt sich bei den entsprechenden Organismen aus den Tiefseeregionen ein großes Vorkommenspotential, da 80% des die Erdoberfläche bedeckenden Wassers eine Temperatur unter 5 °C 10 aufweist. Mikroorganismen aus kalten Regionen haben einen besonders hohen Anteil an PUFAs, die ein Erstarren der Zellwände bei niedrigen Temperaturen verhindern. Die Temperatur des Aktivitätsmaximums dieser Organismen und ihrer funktionellen Bestandteile liegt deutlich unter dem anderer Organismen aus temperierten und tropischen Breiten. Durch den 15 Einsatz von kälteangepassten Mikroorganismen, auch in gentechnisch modifizierter Form, ist damit eine Produktion unter niedrigen Temperaturen mit einem gegenüber den herkömmlichen Gewinnungsverfahren mit nicht kälteangepassten Organismen deutlich geringerem Energieeinsatz entscheidend wirtschaftlicher als bei deren sonst üblichen Aktivitätstemperaturen.

20

Vor dem Hintergrund dieser bedeutenden Erkenntnisse ist es daher die Aufgabe für die vorliegende Erfindung, zur wirtschaftlichen Produktion essentieller Fettsäuren auf Basis eines Enzyms Delta-12-Desaturase einen kälteangepassten Organismus zu finden, der eine Nukleinsäuresequenz 25 aufweist, die für ein kälteangepasstes Enzym Delta-12-Desaturase bei tiefen Prozesstemperaturen kodiert. Die Lösung hierfür ist dem Anspruch 1 zu entnehmen. Vorteilhafte Weiterbildungen und Anwendungen, die sich auch auf das zur beanspruchten Nukleinsäuresequenz zugehörige Polypeptid beziehen, sind den unter- und nebengeordneten Ansprüchen zu entnehmen.

30

Mit der erfindungsgemäßen Lösung werden die an die Erfindung gestellten Anforderungen optimal erfüllt. Zum einen weist der die beanspruchte Nukleinsäuresequenz aufweisende Organismus ein Delta-12-Desaturase-5 Enzym auf, das zur Katalyse eines wichtigen Schritts zur Produktion von essentiellen Fettsäuren besonders geeignet ist, zum anderen entstammt der Organismus der antarktischen See, sodass dieses Enzym zusätzlich auch noch kälteangepasst ist und zu seiner Aktivität keine Wärmezufuhr benötigt wird. Die Kenntnis eines solchen Gens ist von elementarer Wichtigkeit, da 10 dieses für ein kälteangepasstes Δ 12-Desaturase-Enzym kodiert, das besonders für die Pflanzenzucht in gemäßigten und kälteren Breiten interessant ist. Die mikrobielle Fettsäuresynthese erzielt somit mit der schnell wachsenden Kieselalge mit ihrem kälteangepassten Enzym unter niedrigen Temperaturen hohe Erträge.

15

Durchgeführte Sequenzanalysen bestätigen, dass die erfindungsgemäß beanspruchte Nukleinsäuresequenz für ein Δ 12-Desaturase-Enzym kodiert. Durch die heutigen entwickelten Methoden der automatisierten Sequenzierung von Nukleinsäureabschnitten ist es möglich geworden, in überschaubaren 20 Zeiträumen gezielt Gene mit gewünschten Eigenschaften aus aussichtsreichen Organismen zu isolieren. Umfangreiche öffentliche Datenbanken mit bereits bestimmten, bekannten Funktionen zugeordneten Sequenzen dienen der schnelleren Verifizierung der Ergebnisse der mühsamen Suche. Zur Bereitstellung des für die Sequenzierung aufbereiteten Grundmaterials dient 25 eine Reihe von an sich bekannten Arbeitsschritten:

1) Isolation und Kultivierung des Organismus *Fragilariaopsis cylindrus*

Isolation : Während einer Antarktisfahrt mit dem deutschen Forschungseisbrecher „Polarstern“ in die Weddell-See wurde die Kieselalge aus dem Meereis 30 isoliert. Die Artbestimmung erfolgte in einfacher Weise durch die Typisierung

der Struktur der Schale (vergleiche hierzu die **Veröffentlichung II** von Medlin & Priddle : „Polar marine diatoms“, 2nd edition, British Antarctic Survey, Cambridge 1990).

5 **Kultivierung** : Die Kieselalge wurde bei 0°C in einem nährsalzangereicherten Medium 2 x f/2 bei 10 μ mol Photonen m⁻²s⁻¹ mit 24h Licht, gehältert (vergleiche hierzu die **Veröffentlichung III** von Guillard & Ryther : "Studies of marine plancton diatoms, I.Cyclotella nana (Husted) and Detonula confervacea (Cleve)", 1962, Can.J.Microbiol. 8, 229:239). Für eine gesteigerte Expression 10 der für die Kälteanpassung der Art verantwortlichen Gene wurden die Algen in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase auf -2°C abgekühlt. Dies entspricht dem Gefrierpunkt von Meerwasser. Nach 5 Tagen wurden die Boten-RNA (mRNA, messenger RNA) aus den Algen isoliert. Die mRNA repräsentieren alle gerade aktiven Gene, also auch diejenigen, die für die 15 Kälteanpassung verantwortlich sind.

2) Isolation der mRNA

Die gesamte RNA wurde mit dem RNAeasy Plant Mini Kit (Firma Qiagen) 20 isoliert. Aus ca. 100 µg RNA konnte mit Hilfe des Oligotex mRNA Midi Kit (Firma Qiagen) ca. 800 ng RNA für die cDNA-Synthese isoliert werden.

3) Herstellung und Screening einer cDNA-Bank

25 Die cDNA-Bank wurde auf der Basis der mRNA mit dem SMART cDNA-Library Construction Kit (Firma Clontech) hergestellt:

A) Von der mRNA wurde dazu mit Hilfe von Oligonukleotiden und CDS III/3' Primern der erste cDNA-Strang synthetisiert.

B) Anschließend wurde die Doppelstrangsynthese mit Hilfe der LD-PCR (long distance polymerase chain reaction) im Eppendorf-Thermocycler unter folgendem Programm realisiert:

C)

- 5 1. 5 min Denaturierung bei 95°C, anschließend 20 Zyklen von 6 min bei 68°C und 2 min bei 95°C.
2. Nach einem S_FI-Verdau (mit Restriktionsenzym aus *Streptomyces fimbriatus*) der cDNA wurde sie in CHROMA Spin-400 Säulen der Größe nach fraktioniert, so dass nur cDNAs der Länge >400bp (Basenpaare) 10 für die Klonierung zum Einsatz kamen.
3. Diese cDNAs wurden über Nacht bei 16°C in TriPLEX2 Vektoren ligiert, die von λ-Phagen aufgenommen werden konnten. Der Titer dieser cDNA-Bank lag bei 2.7×10^9 pfu/ml (plaque forming units).
4. Ein Blau-Weiß-Screening mit IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactosid) und 15 X-Gal (X-Galactosid) zeigte eine Rekombinationseffizienz von 70%.
5. Diese cDNA-Bank wurde mit Hilfe einer Digoxigenin markierten Δ-12-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* gescreent.
6. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C
7. Die Stringenzwäsche wurde in 2 x SSC / 0,5 x SDS durchgeführt.

20

4) Sequenzanalyse

Positive Phagen-Plaques wurden vom 5'-Ende mit λ-Primern vom Qiagen-Sequencing-Service sequenziert. Die Sequenzen wurden in der Genbank bei 25 NCBI (National Center for Biotechnology Information) mit der BLASTX-Option auf ihre Homologien zu vorhandenen Sequenzen untersucht (25.02.2002). Die Vergleichsergebnisse wiesen Scorewerte zwischen 50 und 80 auf. Eine von 20 positiven Phagen-Plaques konnte zweifelsfrei als Δ-12-Desaturase identifiziert werden.

30

In **Figur 2** ist das Ergebnis einer phylogenetischen Analyse dargestellt. Danach gruppiert die Desaturase aus *Fragilariopsis cylindrus* mit signifikantem bootstrap support (97% bzw. 99%) mit anderen Δ -12-Desaturasen. Es handelt sich daher bei dem kälteangepassten Enzym, das von der beanspruchten 5 Nukleinsäuresequenz nach der Erfindung aus der Diatomee *Fragilariopsis cylindrus* kodiert wird, mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ebenfalls um eine Δ -12-Desaturase.

Sequenzprotokoll

5 <110>Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung,
 Bremerhaven
 10 <120>Für eine Delta-12-Desaturase kodierende neue Nukleinsäuresequenz
 aus der kälteangepassten marinen Diatomee *Fragilariaopsis cylindrus*
 15 <130>AWI 01-0702 DE
 10 <160>1
 20 <210>1
 <211>456
 15 <212>DNA
 <213>*Fragilariaopsis cylindrus*
 <400>1
 25 cc ggg aat tcg gcc att acg gcc ggg gag atc gga tcg act cat gtc 47
 Gly Asn Ser Ala Ile Thr Ala Gly Glu Ile Gly Ser Thr His Val
 1 5 10 15
 30 gct cat cat ttg ttt cac gag atg cca cat tac aat gca tta gag gca 95
 Ala His His Leu Phe His Glu Met Pro His Tyr Asn Ala Leu Glu Ala
 20 25 30
 35 acg cat gcc atc aga gca ttt ttg gaa cca aaa gga ttg tac aat tat 143
 Thr His Ala Ile Arg Ala Phe Leu Glu Pro Lys Gly Leu Tyr Asn Tyr
 35 40 45
 40 gat cct gct cca tgg tac aag gcc atg tgg agg atc gga aaa acg tgc 191
 Asp Pro Ala Pro Trp Tyr Lys Ala Met Trp Arg Ile Gly Lys Thr Cys
 50 55 60
 45 cat tac gtt gaa gct gaa act ggt att caa tat tac aaa tca atg gag 239
 His Tyr Val Glu Ala Glu Thr Gly Ile Gln Tyr Tyr Lys Ser Met Glu
 65 70 75
 50 gat gtt cca ctt aca aag gat ctg aaa aag gat taaagtaatt cataattcaa 292
 Asp Val Pro Leu Thr Lys Asp Leu Lys Lys Asp
 80 85 90
 55 tataccttca attccgctaa attttcctt gttcaattat atcaactaca cgtactgtt 352
 agatactatt acacagacat gtataaaata gtctatataa catcaacata ataatgaaaa 412
 ttgctattat ttacgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 456

Patentansprüche

1. Für ein Enzym Delta-12-Desaturase kodierende Nukleinsäuresequenz,
5 **dadurch gekennzeichnet**, dass
diese aus der kälteangepassten marinen Diatomee *Fragilariaopsis cylindrus*
stammt und gemäß SEQ ID No.1 oder als funktionelle Variante oder als
Abschnitt mit mindestens 8 Nukleotiden davon ausgebildet ist.
- 10 2. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Nukleinsäuresequenz als DNA oder RNA, vorzugsweise als doppel-
strängige DNA ausgebildet ist.
- 15 3. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Nukleinsäuresequenz in einem Vektor, vorzugsweise in einem
Expressionsvektor enthalten ist.
- 20 4. Verwendung der Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3 zur Expression
oder Überexpression des Enzyms Delta-12-Desaturase in Wirtsorganismen.
- 25 5. Zur Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 zugehöriges
Polypeptid, das mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.1 oder als
funktionelle Variante oder als Abschnitt mit mindestens 6 Aminosäuren davon
ausgebildet ist.
- 30 6. Verwendung des zum Protein gefalteten Polypeptids nach Anspruch 5 zur
Anreicherung von vom Enzym Delta-12-Desaturase abhängigen Fettsäuren in
Wirtsorganismen.
7. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 6 als Zusatz zu menschlicher
Nahrung oder in Medikamenten.

1/2

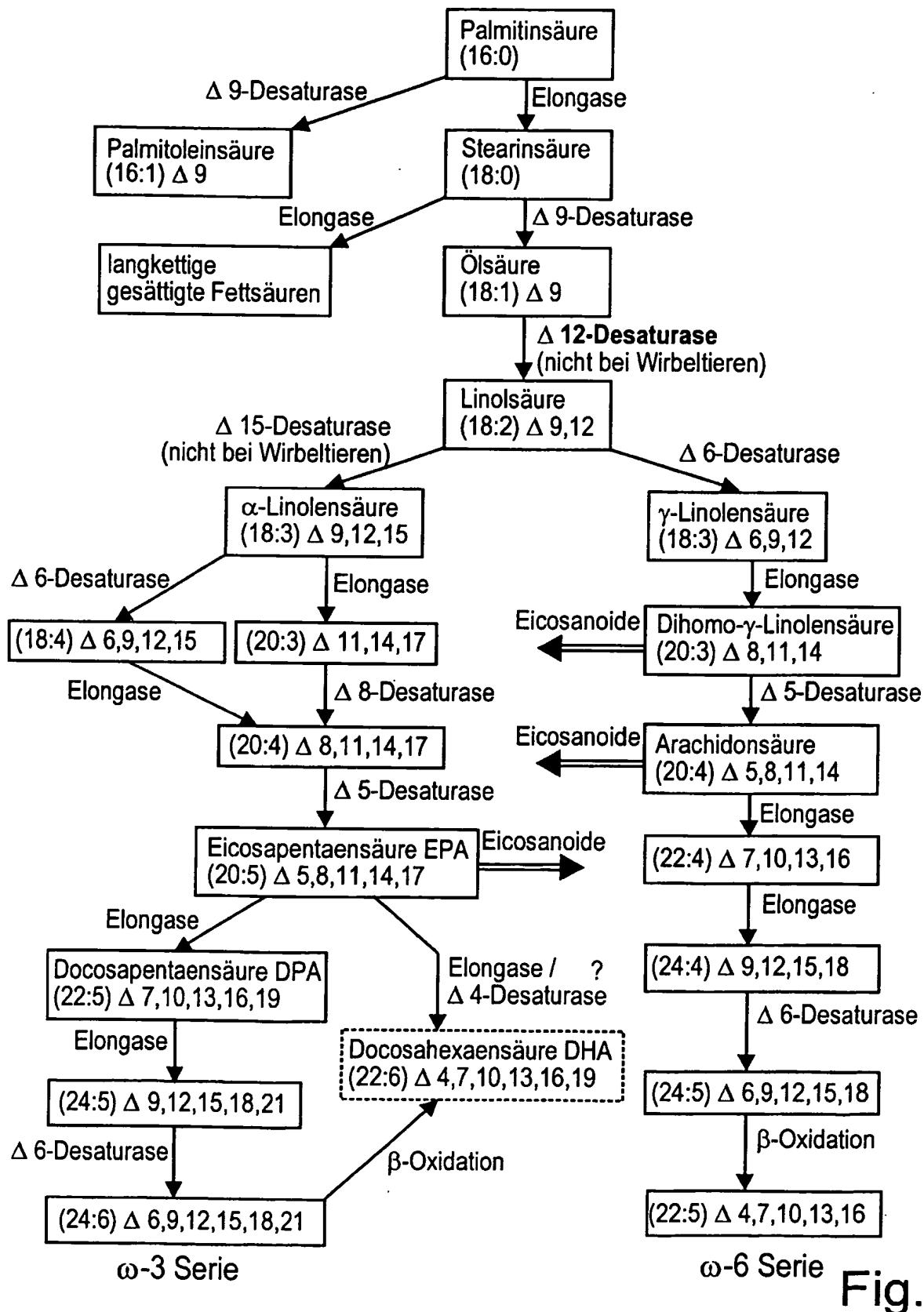


Fig. 1

2/2

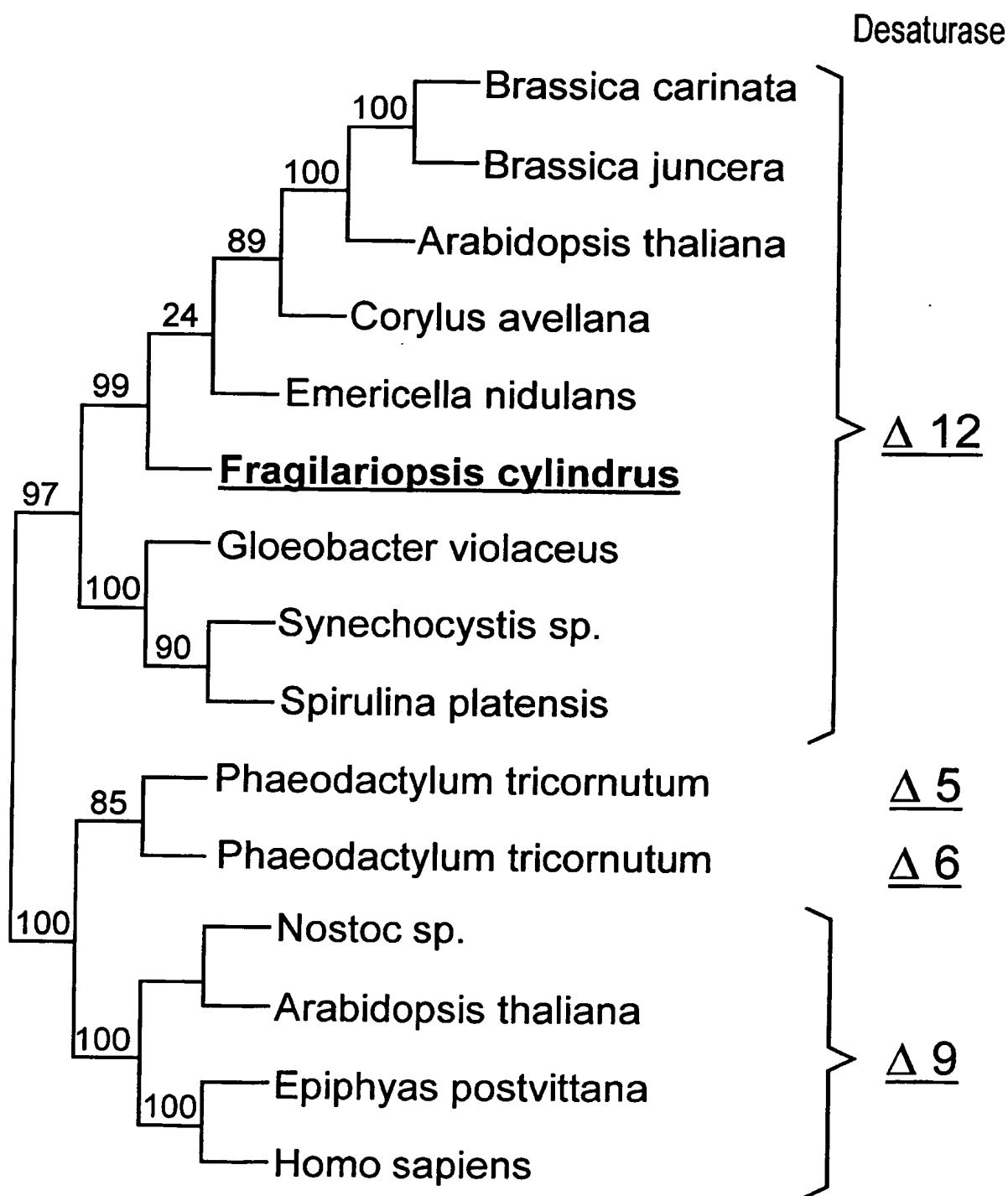


Fig.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 03/02401A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 A61K38/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TOCHER D R ET AL: "RECENT ADVANCES IN THE BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF FATTY ACYL DESATURASES" PROGRESS IN LIPID RESEARCH, PERGAMON PRESS, PARIS, FR, vol. 37, no. 2-3, 7 August 1998 (1998-08-07), pages 73-117, XP001098621 ISSN: 0163-7827 page 90 -page 91 -/-	1-7

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2003

Date of mailing of the International search report

22/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schneider, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE03/02401

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GERSONDE RAINER ET AL: "The reconstruction of late Quaternary Antarctic sea-ice distribution: The use of diatoms as a proxy for sea-ice" PALAEOGEOGRAPHY PALAEOLIMATOLOGY PALAEOECOLOGY, vol. 162, no. 3-4, October 2000 (2000-10), pages 263-286, XP002263050 ISSN: 0031-0182 page 263 page 265 -page 266 ---	1-7
A	ESKE, KRISTIN: "Zahllose Geheimnisse der Natur warten noch unter Wasser" BIOLOG, no. 3, 2000, pages 1-7, XP002263051 Greifswald, Rostock cited in the application page 2 -page 3 ---	
A	WO 98 46763 A (THURMOND JENNIFER ;CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22 October 1998 (1998-10-22) page 1 -page 6 page 21 page 39 -page 45 ---	
A	SAKAMOTO TOSHIO ET AL: "Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 23, no. 6, 1997, pages 1281-1292, XP002263052 ISSN: 0950-382X the whole document ---	
P,X	WO 02 057464 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH ;HEINZ ERNST (DE); DUWENIG ELKE (DE); BISC) 25 July 2002 (2002-07-25) SEQ ID NOs: 11 und 12 page 1 page 29 ---	1-7 -/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 03/02401

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	VALENTIN K.-U. UND MOCK T.: "D12-Desaturase-Enzym aus der kälteresistenten polaren Kieselalge Fragilariaopsis cylindrus" AWI HOMEPAGE, 'Online! 27 April 2003 (2003-04-27), XP002263053 Retrieved from the Internet: <URL: http://www.incywincy.com/default?q=fragilariaopsis&catid=42718&cached=http://www.awi-bremerhaven.de/TT/delta12/index-d.htm > 'retrieved on 2003-11-27! the whole document -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No

PCT/DE 03/02401

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9846763	A	22-10-1998	US 5968809 A AU 726807 B2 AU 6961698 A AU 720677 B2 AU 7114798 A BG 103797 A BG 103798 A BR 9808506 A BR 9808507 A CN 1252099 T CN 1253588 T EP 0975766 A1 EP 0996732 A1 HU 0001236 A2 JP 2001523091 T JP 2001527395 T NO 994925 A NO 994926 A NZ 337457 A NZ 337459 A PL 336077 A1 PL 336143 A1 SK 139899 A3 SK 139999 A3 TR 9902465 T2 TR 9902474 T2 WO 9846763 A1 WO 9846764 A1 US 6410288 B1 US 6136574 A	19-10-1999 23-11-2000 11-11-1998 08-06-2000 11-11-1998 28-04-2000 31-05-2000 23-05-2000 23-05-2000 03-05-2000 17-05-2000 02-02-2000 03-05-2000 28-07-2000 20-11-2001 25-12-2001 30-11-1999 30-11-1999 28-07-2000 28-07-2000 05-06-2000 05-06-2000 16-05-2000 16-05-2000 21-01-2000 21-02-2000 22-10-1998 22-10-1998 25-06-2002 24-10-2000
WO 02057464	A	25-07-2002	DE 10102338 A1 CA 2435091 A1 WO 02057464 A2 EP 1356056 A2 NO 20033268 A	25-07-2002 25-07-2002 25-07-2002 29-10-2003 17-09-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 03/02401A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 A61K38/44

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	TOCHER D R ET AL: "RECENT ADVANCES IN THE BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF FATTY ACYL DESATURASES" PROGRESS IN LIPID RESEARCH, PERGAMON PRESS, PARIS, FR, Bd. 37, Nr. 2-3, 7. August 1998 (1998-08-07), Seiten 73-117, XP001098621 ISSN: 0163-7827 Seite 90 -Seite 91 ---	1-7 -/-

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Veröffentlichung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

27. November 2003

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

22/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schneider, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 03/02401

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	GERSONDE RAINER ET AL: "The reconstruction of late Quaternary Antarctic sea-ice distribution: The use of diatoms as a proxy for sea-ice" PALAEOGEOGRAPHY PALAECLIMATOLOGY PALAEOECOLOGY, Bd. 162, Nr. 3-4, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 263-286, XP002263050 ISSN: 0031-0182 Seite 263 Seite 265 -Seite 266 ----	1-7
A	ESKE, KRISTIN: "Zahllose Geheimnisse der Natur warten noch unter Wasser" BIOLOG, Nr. 3, 2000, Seiten 1-7, XP002263051 Greifswald, Rostock in der Anmeldung erwähnt Seite 2 -Seite 3 ----	
A	WO 98 46763 A (THURMOND JENNIFER ;CALGENE LLC (US); ABBOTT LAB (US); KNUTZON DEBO) 22. Oktober 1998 (1998-10-22) Seite 1 -Seite 6 Seite 21 Seite 39 -Seite 45 ----	
A	SAKAMOTO TOSHIO ET AL: "Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002" MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 23, Nr. 6, 1997, Seiten 1281-1292, XP002263052 ISSN: 0950-382X das ganze Dokument ----	
P,X	WO 02 057464 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH ;HEINZ ERNST (DE); DUWENIG ELKE (DE); BISC) 25. Juli 2002 (2002-07-25) SEQ ID NOs: 11 und 12 Seite 1 Seite 29 ----	1-7 -/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 03/02401

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>VALENTIN K.-U. UND MOCK T.: "D12-Desaturase-Enzym aus der kälteresistenten polaren Kieselalge <i>Fragilariaopsis cylindrus</i>" AWI HOMEPAGE, 'Online! 27. April 2003 (2003-04-27), XP002263053 Gefunden im Internet: <URL:http://www.incywincy.com/default?q=fragilariaopsis&catid=42718&cached=http://www.awi-bremerhaven.de/TT/delta12/index-d.htm> 'gefunden am 2003-11-27! das ganze Dokument -----</p>	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

zur gleichen Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/02401

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9846763	A	22-10-1998	US	5968809 A		19-10-1999
			AU	726807 B2		23-11-2000
			AU	6961698 A		11-11-1998
			AU	720677 B2		08-06-2000
			AU	7114798 A		11-11-1998
			BG	103797 A		28-04-2000
			BG	103798 A		31-05-2000
			BR	9808506 A		23-05-2000
			BR	9808507 A		23-05-2000
			CN	1252099 T		03-05-2000
			CN	1253588 T		17-05-2000
			EP	0975766 A1		02-02-2000
			EP	0996732 A1		03-05-2000
			HU	0001236 A2		28-07-2000
			JP	2001523091 T		20-11-2001
			JP	2001527395 T		25-12-2001
			NO	994925 A		30-11-1999
			NO	994926 A		30-11-1999
			NZ	337457 A		28-07-2000
			NZ	337459 A		28-07-2000
			PL	336077 A1		05-06-2000
			PL	336143 A1		05-06-2000
			SK	139899 A3		16-05-2000
			SK	139999 A3		16-05-2000
			TR	9902465 T2		21-01-2000
			TR	9902474 T2		21-02-2000
			WO	9846763 A1		22-10-1998
			WO	9846764 A1		22-10-1998
			US	6410288 B1		25-06-2002
			US	6136574 A		24-10-2000
WO 02057464	A	25-07-2002	DE	10102338 A1		25-07-2002
			CA	2435091 A1		25-07-2002
			WO	02057464 A2		25-07-2002
			EP	1356056 A2		29-10-2003
			NO	20033268 A		17-09-2003